

## Essai d'enrichissement sur *Thalassiosira pseudonana*

Rejean Tremblay et Diadié Diouf, ISMER-UQAR

### Matériel et Méthode

*Thalassiosira pseudonana* souche Actin a été mise en culture dans des photobioréacteurs de 260 L fonctionnant selon un système semi-continu dénommé procédé à efficacité prolongée pour la production d'algues « PEPPA » développée par l'ISMER pour optimiser le système de production semi-continu de microalgues en améliorant significativement la productivité biologique et la longévité des cultures. Lorsque les cultures ont atteint la fin de la phase de croissance exponentielle, un volume correspondant à environ 30 à 40% par PEPPA (90 à 100 litres) a été transféré dans des bassins de type kwalls (tubes de 200L) pour la mise en œuvre du stress nutritionnel en silicate. À ce moment, le milieu nutritionnel F/2 (Guillard, 1975) non enrichi en silicate a été ajouté. Le stress nutritionnel au silicate a été effectué sur des cultures réalisées à la station aquicole de l'Ismer à Pointe-au-Père durant 10 jours afin d'évaluer l'enrichissement potentiel en acides gras polyinsaturés.

Suite à l'inoculation des photobioréacteurs, les cultures ont été rigoureusement suivies chaque jour (mesure du pH, comptage cellulaire et évaluation de la taille au moyen du compteur de particules Beckman Z2 Counter Coulter, Fullerton, CA, USA). Le plateau de croissance était indiqué par une valeur de compte quasi-constante. À ce moment, un premier échantillon a été prélevé pour les analyses de lipides avant le transfert en kwalls. Par la suite, les échantillons ont été prélevés toutes les 24h durant la période complète du stress en silicate. Aux mesures de pH et de comptage cellulaire, des échantillons pour l'estimation des poids secs et des analyses de lipides ont été ajoutés. La mesure du poids sec des algues est mise en œuvre par filtration d'un volume de 10 ml de culture sur des filtres de type GF/C (0.45µm) d'un diamètre de 2,5cm précuits au four à 450°C pendant 2 h et pesés avant leur utilisation. Une fois l'échantillon filtré, une solution de formiate d'ammonium à 3% a été ajoutée pour dissoudre les sels et les filtres ont été séchés dans l'étuve à 70°C pendant 24 h puis dans un dessiccateur pendant 24 h et pesés.

$$P_a = P_{f+a} - P_f$$

$$PS = P_a / (V*C)$$

$P_f$  : poids filtre sec (avant filtration) en g.

$P_a$  : poids algues séché en g.

$P_{f+a}$  : poids filtres + algues (après séchage) en g.

$V$  : volume filtré en ml.

$C$  : concentration cellulaire en  $10^6$  cellules/ml.

PS : poids sec en g/ $10^6$  cellules

Les échantillons pour les analyses de lipides ont été filtrés de la même manière que pour les poids secs mais sans rinçage au formiate d'ammonium, puis les filtres sont immersés dans des vials contenant 2 mL de mélange chloroforme-méthanol 2:1 (V/V). Ensuite, les vials ont été passés sous un courant d'azote pour préserver les échantillons de l'oxydation, avant d'être congelés à -80°C jusqu'à l'analyse chimique.

La fraction lipidique des échantillons de microalgues a été extraite par la méthode de Folch et al. (1957). Les grandes classes de lipides ont été analysées par Iatroskan MK6™ (Iatron Technologies, Tokyo, Japon) équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et couplé avec un chromatographe à couche mince. Les chromatogrammes ont été intégrés et analysés au moyen du logiciel d'intégration Peak Simple version 3.2, SRI Inc. Les acides gras ont été analysés avec un chromatographe en phase gazeuse de marque Trace GC (Thermo, USA) équipé avec une colonne capillaire VB-5® (30 m x 0,25 mm i.d; ValcoBond®, USA) avec l'hélium de haute pureté comme gaz porteur. Il a été couplé avec un spectromètre de masse Polaris Q (Thermo, USA). La détection et la quantification des FAME ont été réalisées en appliquant le mode en balayage des ions positifs du spectromètre de masse avec un intervalle de masse de 60 à 650 uma. Une calibration externe a été utilisée avec cinq points de calibrage de  $6,25 \mu\text{g ml}^{-1}$  à  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ , à partir des dilutions appropriées du standard FAME dans un mélange hexane:dichlorométhane. Le contrôle de l'appareil, l'acquisition et le traitement des données ont été réalisées avec le logiciel Xcalibur® (revision 1.3) de Thermo (USA).

Les données ont été traitées par analyse de variance multiple (MANOVA) en utilisant le logiciel de statistique SPSS 15.0 pour Windows afin de déterminer les différences entre les classes de lipides (TAG, AMPL, PL) mais aussi entre les différents acides gras (EPA, DHA, AA) et groupes d'acides gras (Saturés, MUFA, PUFA). Le test de Tukey a été utilisé pour déterminer le cas échéant, les différences significatives spécifiques. Les variables dépendantes étaient les grandes classes de lipides ou les différents acides gras et le facteur était le temps de stress.

## Résultats

L'évolution des grandes classes de lipides de *Thalassiosira pseudonana* a démontré que le temps du stress en silicate n'a pas résulté en une augmentation significative de la teneur triglycérides ou triacylglycérols (TAG; Figure 1).

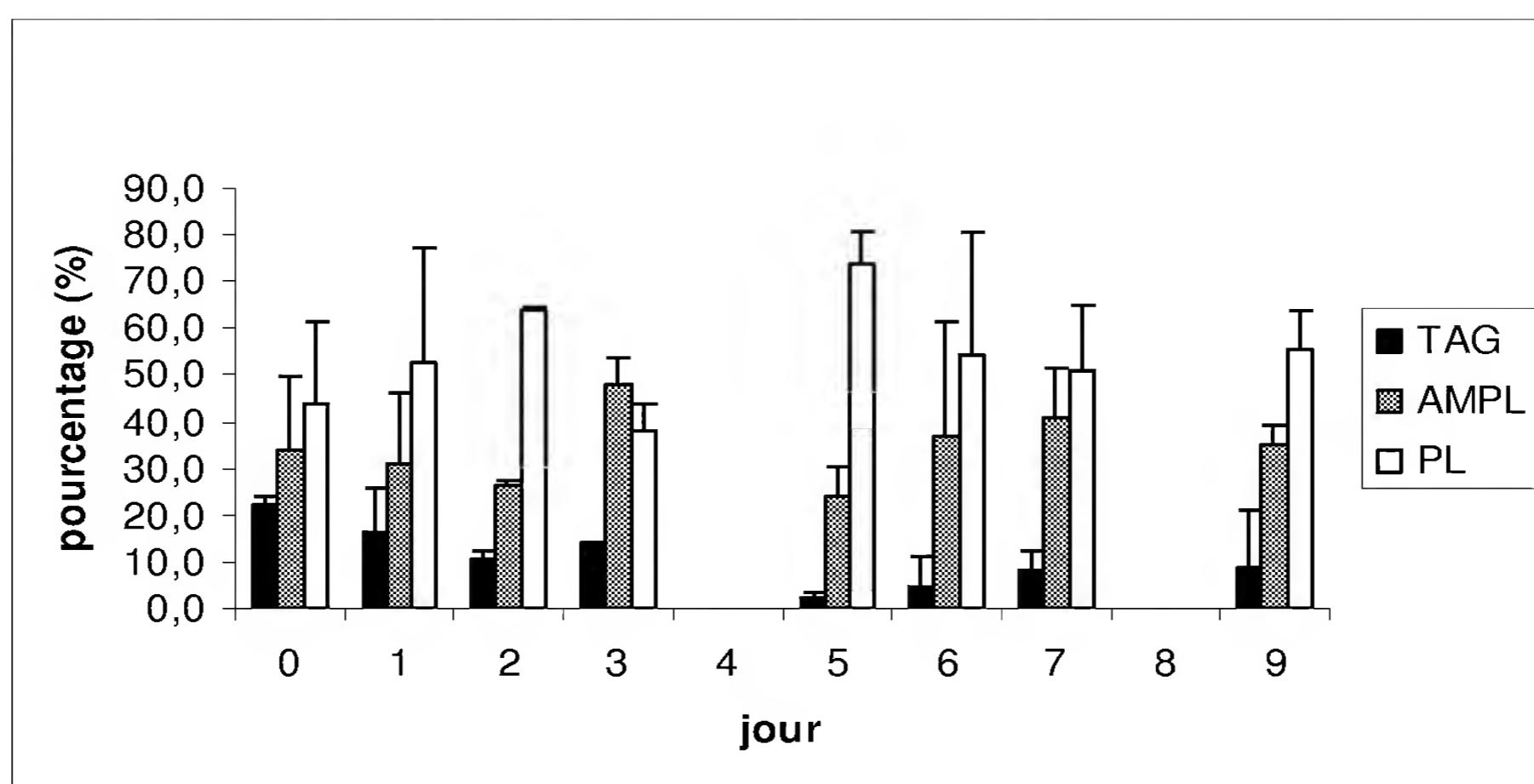


Figure 1 : Évolution des grandes classes de lipides exprimées en %  $\pm$  écarts-types de *Thalassiosira pseudonana* lors du stress nutritionnel

Les résultats des profils en acides gras sont présentés en pourcentage moyen des principaux acides gras avec leurs écarts-types au début et à la fin du stress nutritionnel en silicates pour *Thalassiosira pseudonana* (Tableau 1). Aucune variation importante ne fut observée.

Tableau 1 : Pourcentages moyens d'acides gras  $\pm$  écarts-types pour *Chaetoceros gracilis* et *Thalassiosira pseudonana* avant et après le stress.

| <b><i>Thalassiosira pseudonana</i></b> |                   |                  |
|--|-------------------|------------------|
| <b>acides gras</b>                     | <b>Jour 0</b>     | <b>Jour 9</b>    |
| C12:0                                  | 0,61 $\pm$ 0,03   | 1,02 $\pm$ 0,14  |
| C14:0                                  | 9,97 $\pm$ 1,95   | 10,94 $\pm$ 3,63 |
| C15:0                                  | 1,1 $\pm$ 0,14    | 1,3 $\pm$ 0,15   |
| C16:0                                  | 20,54 $\pm$ 1,38  | 15,48 $\pm$ 3,11 |
| C17:0                                  | 0,49 $\pm$ 0,03   | 0,76 $\pm$ 0,1   |
| C18:0                                  | 1,26 $\pm$ 0,26   | 2,13 $\pm$ 0,44  |
| C20:0                                  | 0,65 $\pm$ 0,04   | 0,95 $\pm$ 1,18  |
| C22:0                                  | 0,85 $\pm$ 0,09   | 1,17 $\pm$ 0,23  |
| C24:0                                  | 1,06 $\pm$ 0,32   | 1,5 $\pm$ 0,24   |
| <b><math>\Sigma</math> saturés</b>     | <b>36,5</b>       | <b>35,3</b>      |
| C16:1n-7                               | 32,52 $\pm$ 10,03 | 21,96 $\pm$ 5,27 |
| C18:1n-9                               | 3,07 $\pm$ 0,21   | 6,04 $\pm$ 0,31  |
| C20:1                                  | 0,55 $\pm$ 0,04   | 0,83 $\pm$ 0,16  |
| C22:1n-9                               | 0,5 $\pm$ 0,1     | 0,71 $\pm$ 0,12  |
| <b><math>\Sigma</math> MUFA</b>        | <b>36,6</b>       | <b>29,5</b>      |
| C18:2n-6                               | 1,09 $\pm$ 0,02   | 1,47 $\pm$ 0,1   |
| C20:2                                  | 0,63 $\pm$ 0,03   | 0,92 $\pm$ 0,19  |
| C18:3n-6                               | 0,54 $\pm$ 0,01   | 3,45 $\pm$ 0,55  |
| C20:3n-3                               | 0,55 $\pm$ 0,03   | 0,81 $\pm$ 0,16  |
| C20:3n-6                               |                   | 0,56 $\pm$ 0,11  |
| C20:4n-6 (AA)                          | 0,75 $\pm$ 0,09   | 1,07 $\pm$ 0,06  |
| C20:5n-3 (EPA)                         | 15,77 $\pm$ 2,55  | 16,6 $\pm$ 8,67  |
| C22:6n-3 (DHA)                         | 5,72 $\pm$ 1,98   | 7,33 $\pm$ 3,87  |
| <b><math>\Sigma</math> PUFA</b>        | <b>25,1</b>       | <b>32,2</b>      |
| <b>Total</b>                           | <b>98,2</b>       | <b>97</b>        |

Comme pour les grandes classes de lipides, la durée du stress nutritionnel en silicate n'a pas eu d'effet sur les valeurs d'acides gras pour *Thalassiosira pseudonana* ( $p > 0,05$  ;  $df = 16$ ). Les figures 2 et 3 montrent le profil constant des acides gras principaux (EPA et DHA) et des groupes d'acides gras saturés, monoinsaturés et polyinsaturés.

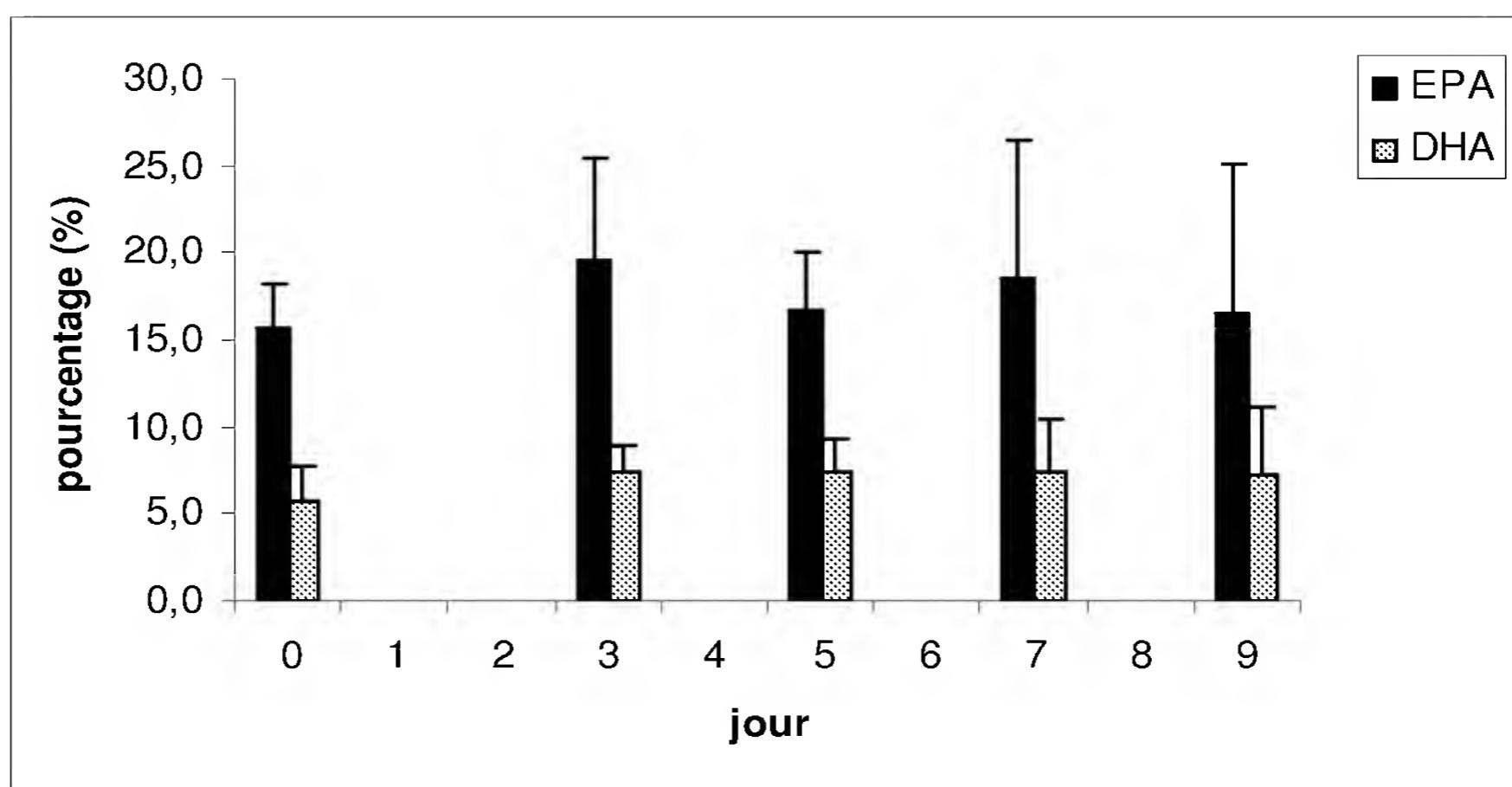


Figure 2 : Évolution des principaux acides gras essentiels exprimés en %  $\pm$  écarts-types de *Thalassiosira pseudonana* lors du stress nutritionnel

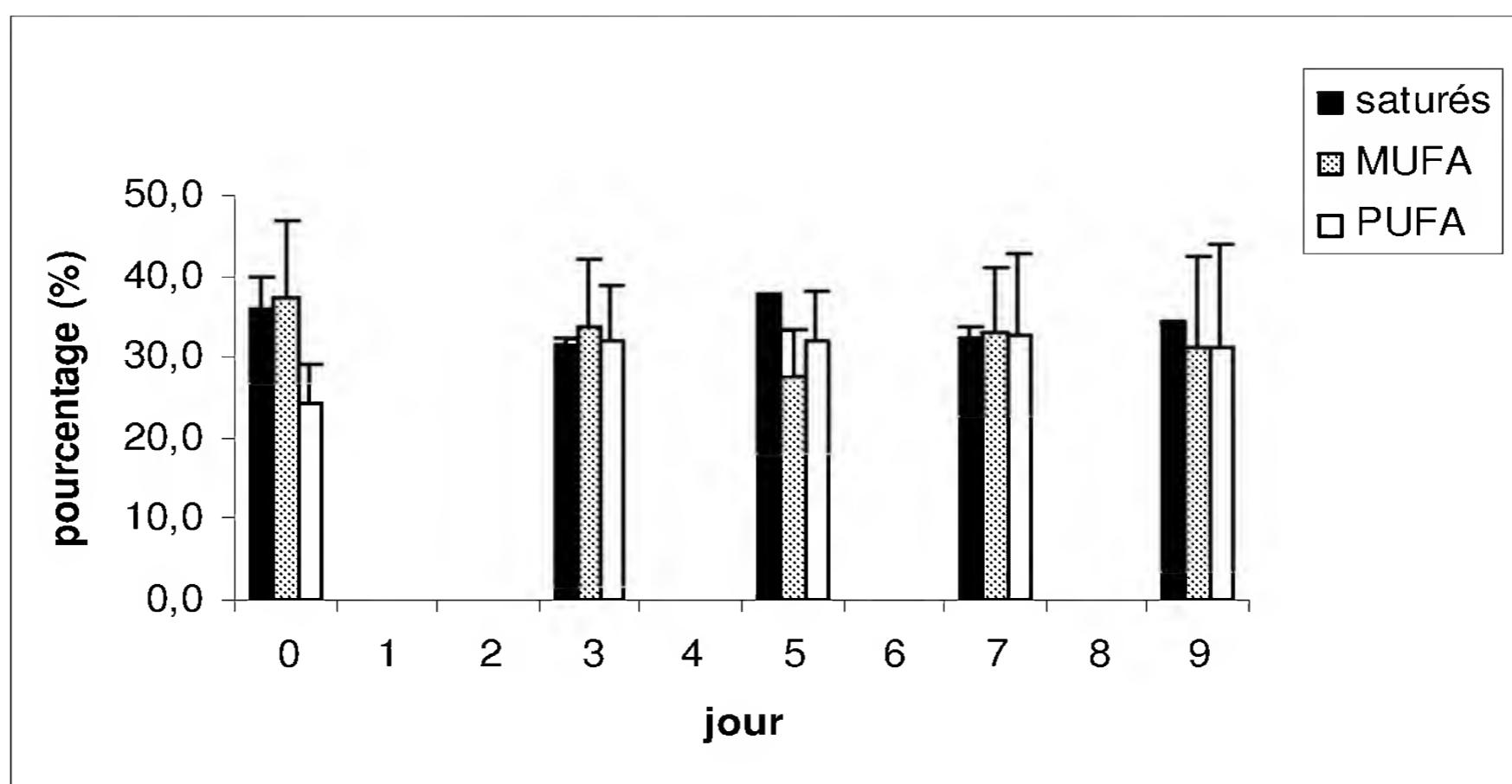


Figure 3 : Évolution des acides gras saturés, monoinsaturés et polyinsaturés exprimés en %  $\pm$  écarts-types de *Thalassiosira pseudonana* lors du stress nutritionnel

## Discussion

Cette étude a été réalisée sur une diatomée centrale *Thalassiosira pseudonana* caractérisées par la présence d'un frustule en silice jouant un rôle primordial dans la division cellulaire. Dans la nature, cette carapace siliceuse est synthétisée par l'algue à partir de la silice naturelle. En conditions de culture, la silice doit être apportée par le milieu nutritionnel pour permettre à l'algue unicellulaire de se reproduire. Ainsi le principe de ce stress nutritionnel est basé sur le retrait d'un élément ayant une fonction vitale pour le développement du phytoplancton. Le but étant d'allouer au développement cellulaire du végétal, les réserves énergétiques emmagasinées pour la reproduction. Nous avons déjà démontré qu'un stress en silicate permettait d'accroître

significativement la teneur en acides gras polyinsaturés chez la diatomée centrale *Chaetoceros gracilis* et la diatomée en bâtonnet *Skeletonema costatum*. Les diatomées réagissent plus rapidement à une déficience en silicate qu'à un autre nutriment du fait qu'elles ne peuvent pas former de cellules filles sans apport de silicates. En effet, les silicates sont apportés sous forme de métasilicate qui est hydrolysé en acide orthosilicique  $\text{Si(OH)}_4$ , et sont déposés sur le frustule de la diatomée sous forme de silice amorphe hydratée. Si les diatomées ne sont pas capables de former un frustule, elles accumulent des lipides sous forme de triglycérides ou triacylglycérols (TAG) qui constituent à ce titre, un important signal biochimique de l'occurrence d'un stress naturel ou artificiel. Dans cette étude, la diatomée testée (*Thalassiosira pseudonana* souche Actin) n'a pas réagi à la déficience nutritionnelle en silicates. Par exemple, la composition moyenne des acides gras durant le stress nutritionnel montre des pourcentages moyens en EPA de 15,8% au début et de 16,6% à la fin du stress. Les valeurs obtenues en acide gras sont typiques de celles observées dans la littérature pour cette espèce. Par exemple, nos valeurs en EPA et en DHA sont respectivement de 15,8% et 5,7%, ce qui est assez proches de celles de Zhukova (2004) avec des valeurs de 19,3% pour l'EPA et 2,2% pour le DHA.

Zhukova N.V., 2004. Changes in the lipid composition of *Thalassiosira pseudonana* during its life cycle. *Russian Journal of Plant Physiology* 51, 5, 702-707.